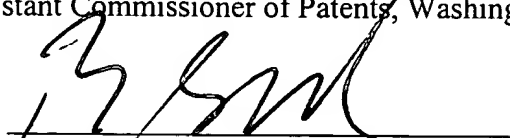


MAIL CERTIFICATION

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner of Patents, Washington, D.C. 20231 on August 15, 2000


Bruce S. Londa

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Atty's Docket No.: 101195-2

GROUP ART UNIT :

EXAMINER :

APPLICANT : Margret Hoehe et al.

APPLN. NO. : 09/582,719

FILED : June 29, 2000

FOR : Novel Sequence Variants of the Human Beta 2-Adrenergic Gene and Use Thereof

Hon. Assistant Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

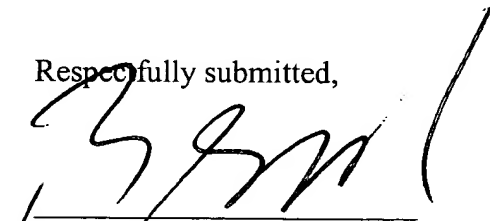
Sir:

In support of the claim of priority made by the applicant at the time of filing, transmitted herewith is a Certified Copy of the following application:

German Patent Application No. 197 58 401.2 filed December 30, 1997

It is respectfully requested that receipt of the Certified Copy be acknowledged promptly to the undersigned.

Respectfully submitted,


Bruce S. Londa
Norris, McLaughlin & Marcus P.A.
20 Exchange Place, 37th Floor
New York, New York 10005
Telephone: (212) 968-1300
Telecopier: (212) 968-1307



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 197 58 401.2

Anmeldetag: 30. Dezember 1997

Anmelder/Inhaber: Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
Berlin/DE

Bezeichnung: Neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-
adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung

IPC: C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Hiebing'.

Hiebing



Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Dr. Margret Hoehe, Bernd Timmermann

Neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung zur Diagnose eines Spektrums von Erkrankungen, insbesondere zur Feststellung von Bluthochdruck-Dispositionen und zur Therapeutika-Entwicklung auf der Basis einer individuellen Pharmakokinetik..

Der menschliche beta2-adrenerge Rezeptor ist eine wichtige Komponente des sympathischen Nervensystems und reguliert als solche ein Spektrum zentraler und peripherer Funktionen, wie z.B. Schlaf-Wach-Rhythmus, Bewusstseinsfunktionen, Neurosekretion, Herz-Kreislauf-Funktionen, metabolische Funktionen. Er ist Angriffspunkt von Pharmaka/Therapeutika mit einem breiten Indikationsspektrum, die mit zu den am häufigsten verordneten Medikamenten gehören. Vielfältige Befunde weisen daraufhin, daß dieser Rezeptor eine Rolle in der Pathogenese/Pathophysiologie einer Reihe häufiger Erkrankungen spielen könnte, wie z.B. der Hypertonie und anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Depression, und metabolischen Erkrankungen wie z.B. Fettsucht (Insel PA (Ed) (1987) Adrenergic receptors in man, Marcel Dekker, New York, Basel).

Die Erfindung hat das Ziel, Varianten, Polymorphismen, Mutationen und resultierende Haplotypen in der DNA-Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens zu ermitteln und deren Korrelationen mit Krankheitsdispositionen festzustellen. Ausgehend von diesen Korrelationen soll ein Verfahren zur Diagnose dieser Krankheitsdispositionen sowie ein System zur Therapeutika-Entwicklung für diese Krankheiten entwickelt werden.

Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen 1, 9 und 14 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Es wurde gefunden, daß in der 5'-regulierenden Region der Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens neben den 2 schon bekannten Mutationen in der kodierenden Region (an den Positionen 1633 und 1666) weitere Mutationen vorhanden sind. Es wurde ferner gefunden, daß diese genetischen Varianten mit der Disposition für verschiedene Krankheiten, z. B. Bluthochdruck, korrelieren.

Gegenstand der Erfindung ist danach die Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens, die an den Positionen 245, 565, 934, 1541, 1568, 1633 und 1666 ganz oder teilweise mutiert ist. Es handelt sich insbesondere um eine Sequenz, die ganz oder teilweise die Mutationen A→G (Position 245), G→A (Position 565), G→A (Position 934), C→T (Position 1541), T→C (Position 1568), A→G (Position 1633) und Gln→Glu (Position 1666) enthält. Besonders wichtig sind folgende Sequenzen(Haplotypen):

- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1633 A und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 C, 1633 G und 1666 G,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1633 G und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 A und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 C, 1568 C, 1633 G und 1666 G sowie die
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 G und 1666 C.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an 4 der 7 Positionen 245, 565, 934, 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird. Bevorzugt

sind Ausführungsformen, in denen alle 7 Positionen bzw. die 4 letztgenannten Positionen genotypisiert werden.

Das Verfahren kann auch variiert werden, indem mindestens 3 der 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird. Bevorzugt ist hier die Genotypisierung der Positionen 1541, 1633 und 1666.

Die Genotypisierung erfolgt durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind. Dazu gehören PCR-gestützte Genotypisierungsverfahren wie z. B. allelspezifische PCR, andere Genotypisierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden sowie Verfahren unter Verwendung von Restriktionsenzymen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich u. a. eine Disposition für Bluthochdruck und andere cardiovaskuläre Erkrankungen bestimmen. Weiterhin kann auch eine individuell unterschiedliche Reaktivität des autonomen Nervensystems, z. B. eine unterschiedliche Streßtoleranz bestimmt werden. Eine Korrelation mit neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Angstsyndromen sowie mit metabolischen Erkrankungen wie Fettsucht liegt im Bereich des Möglichen.

Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der beanspruchten Sequenzvarianten zur Entwicklung von Therapeutika u. a. zur Entwicklung von beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten, zum Aufbau von Genen bzw. Vektoren, insbesondere zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen sowie zur Entwicklung eines diagnostischen Kits. Solche Kits können vorteilhaft zur Vorhersage der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene beta2-Rezeptorenblocker und zur Vorhersage der unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen eingesetzt werden.

Der Umfang der beanspruchten Erfindung wird im folgenden ausführlich dargestellt. Zur Erarbeitung der Erfindung wurde die gesamte bekannte DNA-Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens einschließlich seiner regulierenden und kodierenden Regionen in Patienten und Kontrollen mittels der 'Multiplex PCR Sequenzierung'

untersucht, und zunächst eine Reihe von genetischen Varianten identifiziert. In der 5' regulierenden Region wurden zum bestehenden Zeitpunkt fünf neue Varianten entdeckt, deren wichtigste der Austausch eines hochkonservierten Arg->Cys im 'Leader Peptide' des Genes (Position 1541) zu sein scheint, das die Translation des Rezeptorgens reguliert (Position -47 relativ zum Translationsstartpunkt).

Zusammenfassung der neu identifizierten Varianten (Nukleotidposition vor dem Austausch ist in Bezug auf die veröffentlichte beta2-Rezeptorgensequenz, (Kobilka B.K et al, Proc.Natl.Acad.Sci USA; 84(1): 46-50 (1987)[Acc. No. J02960]; die Angabe in Klammern hinter dem Austausch bezieht sich auf den Translationsstart):

245 A → G (-1343)

565 G → A (-1023)

934 G → A (-654)

1541 C → T (-47) Arg → Cys Austausch im 'Leader Peptide' des beta2-Rezeptorgens

1568 T → C (-20)

Diese Varianten sind in den Abbildungen 1 und 2 übersichtlich dargestellt.

Korrelationen mit Erkrankungen bzw. klinisch relevanten Phänotypen:

Spezifische Einflüsse der beiden bisher bekannten Mutationen (Arg->Gly an Position +46 relativ zum Translationsstartpunkt (Position 16 der Aminosäuresequenz) und an Position +79 (27), Gln->Glu) sowie der neu entdeckten 'Leader Peptide' Mutation (Arg->Cys) auf eine Reihe von klinisch und pathogenetisch relevanten Phänotypen wurden in mehreren Studien nachgewiesen. So wurde eine signifikante Assoziation des Arg Allels (Position +46 relativ zum Translationsstartpunkt; Position 16 der Aminosäuresequenz) mit genetischer Prädisposition zur Hypertonie, sowie erhöhten Blutdruckwerten festgestellt. Im weiteren haben die beschriebenen drei Mutationen einen signifikanten Effekt auf phänotypische Parameter wie Herzfrequenz, Noradrenalin-Konzentrationen, Blutdruckveränderungen auf experimentell induzierten physischen und mentalen Stress, sowie 'coping styles' und Persönlichkeitsdimensionen. Im besonderen wurde eine Assoziation der 'Leader Peptide'-Mutation mit Hypertonie gezeigt.

Detektion spezifischer Dreierkombinationen der Mutationen an Positionen (relativ zur veröffentlichten beta2-Sequenz, Kobilka et al. 1987) 1541 C → T ('Leader Peptide' Mutation Arg->Cys), 1633 A → G (Arg->Gly), und 1666 C → G (Gln->Glu):

Kombination 1: 1541 T (Cys Allel), 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 1541 C (Arg Allel), 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 1541 T (Cys Allel), 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Diese drei spezifischen Kombinationen kommen in 80 - 95% der Bevölkerung vor, sie scheinen evolutionär aus der Gesamtanzahl zu erwartender Kombinationen selektioniert zu sein und stellen verschiedene funktionale Zustände des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptors dar, die der Variabilität physiologischer und pathophysiologischer Funktionen zugrundeliegen. Im besonderen sind sie mit einer individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf endogene Liganden wie Adrenalin und Noradrenalin verbunden, sowie mit einer unterschiedlichen therapeutischen Ansprechbarkeit auf beta2 Rezeptoragonisten und -antagonisten, was diese 'Kombinationen' zum Ausgangspunkt zur Entwicklung 'individuell maßgeschneiderter Pharmakotherapie' machen kann.

Detektion spezifischer beta2- 'Haplotypen' bestehend aus vier Varianten: an Positionen (relativ zur veröffentlichten beta2-Sequenz, Kobilka et al. 1987) 1541 C → T ('Leader Peptide' Mutation Arg->Cys), 1568 T->C; 1633 A → G (Arg->Gly), und 1666 C → G (Gln->Glu):

Kombination 1: 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 1541 C (Arg Allel), 1568 C, 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 1 wurde signifikant häufiger bei Individuen beobachtet, die erblich mit Hypertonie belastet waren, und stellt somit einen genetischen Risikofaktor dar.

Detektion spezifischer beta2- 'Haplotypen' bestehend aus sieben Varianten:

Unter rechnerischer Berücksichtigung aller Varianten konnten 'Haplotypen', die aus sieben Varianten (einschließlich der drei genannten Mutationen) bestehen, extrahiert werden; den Berechnungen lag das Ziel zugrunde, 'Haplotypen' aus der Gesamtheit des Genoms zu identifizieren, die hinreichend waren, die Patientengruppe von der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Ein spezifischer 'Haplotyp', Kombination 1, läßt sich bei genetischer Belastung mit Hypertonie häufiger beobachten, und dies läßt sich auf andere Phänotypen erweitern.

Kombination 1: 245 G, 565 G, 934 A, 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 245 A, 565 A, 934 G, 1541 C (Arg Allel), 1568 C, 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 245 G, 565 G, 934 G, 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Diese zuletzt beschriebenen 'Haplotypen' beschreiben schließlich den realen, gesamten individuellen Funktionszustand des Rezeptors. Der Erfindung liegt das Konzept zugrunde, daß es nicht einzelnen Mutationen sind, die unterschiedlichen funktionellen (dysfunktionalen) Rezeptorzuständen zugrundeliegen, sondern diese durch die individuelle 'polymorphe' Gesamtgenesequenz als funktionsdeterminierender Einheit bedingt werden.

Die Erfindung wird anschließend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert.

Material und Methoden

Für die Erhebung des gesamten polymorphen Spektrums des ~~beta~~^{gens}2-Rezeptor wurde die Multiplex-PCR-Sequenziermethode verwendet. Hierzu wurde die gesamte bisher bekannte Promoterregion und die ~~k~~odierende Region in acht Fragmente unterteilt und mittels PCR amplifiziert (siehe Abb.1). Diese PCR Fragmente wurden gepoolt und simultan sequenziert. Die Fragmente der Terminationsreaktionen wurden auf einem Sequenzgel aufgetrennt und mittels ~~direkt~~^{direkt} Transfer Elektrophorese (DTE) auf eine Nylonmembran übertragen. Die ~~De~~kodierung der einzelnen Sequenzleitern erfolgte durch sukzessives Hybridisieren mit spezifischen Oligonukleotiden.

Die spezifischen Bedingungen für die Amplifikation waren wie folgt:

Für Fragment I wurde der Vorwärtsprimer ADRBR-F1 mit der Sequenz: 5'-TATTGGCCAGGATCTTTTGCTTCTAT-3' und der Rückwärtsprimer ADRBR-R1 mit der Sequenz: 5'-TAACATTAAGAACATTTTGAAGC-3' verwendet. Fragment II wurde mit Hilfe der beiden Primer ADRBR-F2: 5'-GCATACCCCCGCTCCAGATAAA-3' und ADRBR-R2: 5'-GCACGCACATACAGGCACAAATAC-3' amplifiziert. Für Fragment III waren es die beiden Primer ADRBR-F3: 5'-GGCCGCGTTTCTGTGTTGG-3' und ADRBR-R3: 5'-AGTGCGTTCTGCCGTTATGTG-3'. Für Fragment VIII die beiden Primer ADRBR-F8: 5'-GGTACTGTGCCTAGCATAAC-3' und ADRBR-R8: 5'-TAAAATACCCCCGTGTGAGCAAATAAGAG-3'. Die Reaktionsbedingungen für diese vier Fragmente waren wie folgt: 10 x PCR Puffer (100mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 500 mM KCl, pH 8,3), dNTP 2 mM, 30 µM Primer F, 30 µM Primer R, 50 ng genomische DNA und 5 U einer *Taq* DNA Polymerase. Alle drei Fragmente wurden mit

folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 94 °C 4 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 1 min und abschließend 72 °C 10 min.

Fragment IV wurde mit Hilfe der beiden Primer ADRBR-F4: 5'- GGGGAGGGGAAAGGGGAG GAG-3' und ADRBR-R4: 5'- CTGCCAGGCCCATGACCAGAT-3' amplifiziert. Für Fragment VII wurden die Primer ADRBR-F7: 5'- CTGGCTGCCCTTCTTCATCGTT-3' und ADRBR-R7: 5'- TACCCTCAAGTTAAATAGTCTGTT-3' verwendet. Die Bedingungen für diese beiden PCR-Reaktionen waren wie folgt: 10 x PCR Puffer (160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween-20, 500 mM KOH, pH), dNTP 2 mM, 30 µM Primer F, 30 µM Primer R, 50 ng genomische DNA und 4 U eines Gemisches aus einer *Taq* DNA Polymerase und einer thermostabilen inorganischen Pyrophosphatase von *Thermus thermophilus*. Beide Fragmente wurden mit folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 94 °C 4 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 66 °C [Fragment IV] bzw. 60 °C [Fragment VII] 30 sec, 72 °C 1 min und abschließend 72 °C 10 min.

Fragment V wurde mittels der beiden Primer ADRBR-F5: 5'- ATGCGCCGGACCACGAC-3' und ADRBR-R5: 5'- GTAGAAGGACACGATGGA-3' amplifiziert, Fragment VI mit den beiden Primern ADRBR-F6: 5'- GCTACTTTGCCATTACTTCACC-3' und ADRBR-R6: 5'- AAATCT GGGCTCCGGCAGTAGATAAG-3'. Diese beiden Fragmente wurden mit Hilfe des „AmpliTaQ Gold Kits“ von Perkin Elmer amplifiziert. Das Temperaturprofil bei diesen beiden Fragmenten war wie folgt: 94 °C 10 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 56 °C [Fragment V] bzw. 58 °C [Fragment VI] 30 sec, 72 °C 1 min und abschließend 72 °C 10 min.

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des „Thermo Sequenase cycle sequencing kit“ von Amersham. Als Sequenzierprimer wurden die oben beschriebenen PCR Primer verwendet. Die Sequenzierung wurde in vier Multiplex-Pools durchgeführt. Pool 1 enthielt die Sequenzierprimer ADRBR-F1, ADRBR-F3, ADRBR-F5 und ADRBR-F7; Pool 2 die Sequenzierprimer ADRBR-R1, ADRBR-R3, ADRBR-R5 und ADRBR-R7. In beide Sequenzier-Poole wurden die PCR-Fragmente I, III, V, und VII eingesetzt. Pool 3 hingegen enthielt die Sequenzierprimer ADRBR-F2, F4, F6 und F8; Pool 4 die Sequenzierprimer ADRBR-R2, R4, R6 und R8. In diese beiden Poole wurden die Fragmente II, IV, VI und VIII eingesetzt.

Sämtliche PCR- und Sequenzierungsreaktionen wurden in einem PTC 225 Cycler von MJ Research durchgeführt.

Die Produkte der Sequenzreaktionen wurden auf einem 100 µm dicken Acrylamidgel (5% Acrylamid, 7 M Harnstoff) aufgetrennt und unter Standard DTE Bedingungen (siehe Richterich and Church, 1993) auf eine Biodyne A Membran (Pall) übertragen. Die Membran wurde dann mit ³²P-

markierten Oligonukleotiden hybridisiert und die einzelnen Sequenzleitern mit Hilfe eines Phosphor-Fluorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) detektiert.

Literatur

Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle T., Dohlman H.G., Bolanowski M.A., Sigal I.S., Yang Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 84(1): 46-50 (1987).

Parola A.L. and Kobilka B.K. The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis. *J Biol Chem.* 269(6): 4497-505 (1994).

Richterich P. and Church G.M.: DNA sequencing with direct transfer electrophoresis and nonradioactive detection. *Methods Enzymol.* 218: 187-222. (1993).

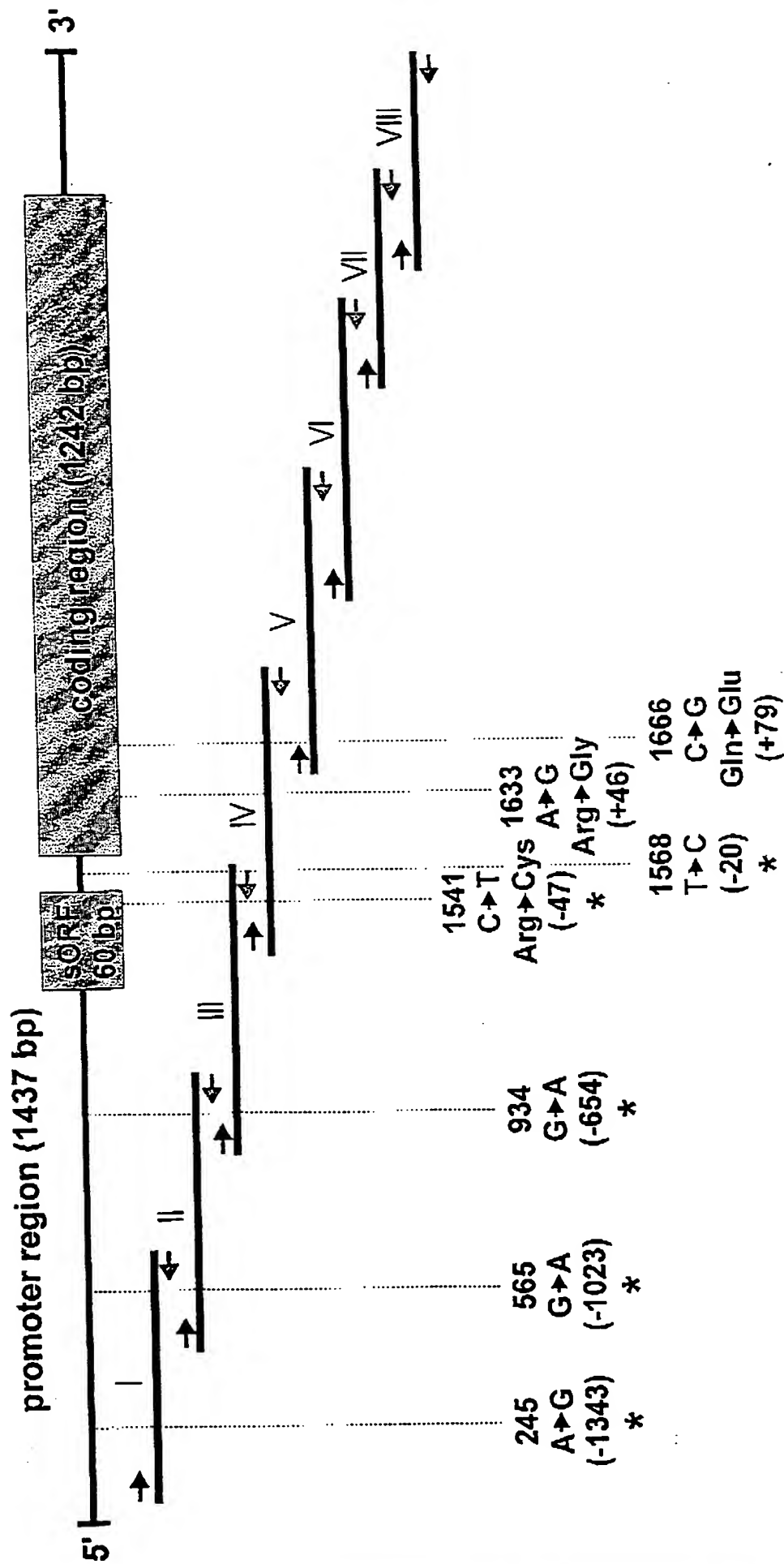


Abb. 1: Genomisches Profil des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptors. Eingezeichnet ist die Position der detektierten Varianten. Die obere Zahl bezieht sich auf die Referenzsequenz von Kobilka et al. 1987; die in Klammern gesetzte Zahl auf den Translationsstart. Die neu detektierten Varianten sind mit einem Stern markiert.

CCGGGTTCAAGAGATTCTCTGCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGGACTACAGGTACGTGCCACACACCTGGCTAATTTTGTATTTTAGTAGAGACA
 100
 GGGCCCAAGTTCTCTAAGAGGACAGAGTCGGAGGGCTCATCGACCCCTGATGTCCATGCACGGTGGTGTGGACCGATTAAAAACATAAAAAATCATCTCTGT

AGAGTTACACCATAATTGGCCAGGATCTTTTGCITTTCTATAGCTTCAAAATGTTCTTAAGACATTCITTAATACTCTGAACCATATGAATTTGCCA
 200
 TCTCAATGTGGTATAACCGGTCTCTAGAAAACGAAAGATATCGAAGTTTACAAGAAATTACAATTCCTGAAGAATTATGAGACTTGGTATACTTTAAACCGT

245 G (-1343)

TTTTGGTAAGTCACAGAGCCAGATGGTGGCAATTTTCACATGGCACAACCCGAAAGATTAAACAAATATCCAGCAGATGAAAGGATTTTTTTAGTTTCA
 300
 AAAACCATTCAGTGTCTGCGGTCTACCCACCGTTAAAGTGTACCGTGTGGCCTTCTAATTGTTGATAGGTGCTCTACTTTCCTAAAAAAATCAAAGT

□

TTGGGTTTACTGAAGAAATTGTTTGAATTCTCATTTGCAATCTCCAGTTCACAGATAATGAGTGAGTGAIGCCACACATCAAGAGTTAAAAACAAACAA
 400
 AACCCTAATGACTTCTTTAACAAACTTAAGAGTAACGTAGAGGTCAAGTTGTCTATTACTCACCTACTACGGTGTGAGAGTTCICAATTTTGTGTTGTT

CAAAAAATTAAAAACAAAGCACACAACITTCCTCTCTGTCCTCCCAAAATACATATCTGCTACCCCGCTCCAGATAAAATCCAAAGGGTAAACCTGTCT
 500
 GTT.TTTTAAATTTGTTTTCGTGTGTTGAAGAGAGAGACAGGGTTTATGATGAACGTATGGGGCGAGGTCTATTTAGGTTTCCCATTTTGACAGA

565 A (-1023)

TCATGCCTGCAAAATTCCTAAGGAGGGCACCTAAAGTACTTGACAGCGAGTGTGCTGAGGAAATCCGAGCTGTTGAAGTCACCTCCTGTCTTTGCCAA
 600
 AGTACGGACGTTAAGGATTCCCTCCGTGGATTTCAIGAAGTGTGCTCACACGACTCCTTTAGCCGTCGACAACTTCAGTGGAGGACACGAGAACGGTT

□

Abb.2: Sequenz des menschlichen beta2- adrenergen Rezeptorgens mit Varianten

ATGTTTGAAAGGGAATACACTGGGTACCGGCTGTATGTTGGAGGGGAGCAATTATCAGTGCCTGGGTGAGGCAAGTTCGGAGTACCCAGATGGAGACAT
TACAAACTTTCCTTATGTGACCCCAATGGCCCAATACAAACCTCCCTCGTAATAGTCACGAGCCCACTCCGTTCAAGCCTCATGGGTCTACCTCTGTA

700

CCGTGCTGTGTCGCTCGATGCCCTCCAAGCCAGCGTGTGTTTACTTTCTGTGTGTACCATGTCTTTGTGCTTCTGGGTGCTTCTGTGTTGTTTC
GGCACAGACACAGCGAGACCTACGGAGGTTTCGGTCGCACACAAATGAAAGACACACACAGTGGTACAGAAACACGAAGACCCACGAAGACACAAACAAAG

800

TGGCCGCGTTTCTGTGTTGGACAGGGTGACTTTGTGCCGGAAGCTTCTGTGTGAGAGCGCGCGGAGTGTGCATGTCTGGGTGAGCTGGGAGGGTGTGTC
ACCGCGCAAGACACAACTGTCCCCACTGAAACACGGCTTACCGAAGACACACTCTCGCGCGGCTCACACGTACAGCCACTCGACCCCTCCCACACAG

900

934 A (-654)



TCAGTGTCTATGGCTGTGGTTTCGGTATAAGTCTCAGCATGTCTGCCAGGGTGTATTTGTGCCTGTATGTGCGTGCCCTCGGTGGGCACTCTCGTTTCCTTC
AGTCACAGATACCGACACCAAGCCATATTCAGACTCGTACAGACGGTCCCACATAAACACGGACATACACGCACGGAGCCACCCGTGAGAGCAAAAGGAAG

1000



CGAATGTGGGGCAGTGCCGGTGTGCTGCCCTCTGCCCTTGAGACCTCAAGCCGGCAGGCGCCAGGGCAGGCAGGTAGCGGCCACAGAGAGCCAAAAGC
GCTTACACCCCGTCACGGCCACACGACGGGAGACGGAACCTCTGGAGTTCGGCGCGTCCGCGGTCCCGTCCATCGCCGGTGTCTCTCGGTTTTTCG

1100

TCCCGGGTTGGCTGGTAAGGACACCCTCCAGCTTAGCCCTCTGGGGCCAGCCAGGGTAGCCGGGAAGCAGTGGTGGCCCGCCCTCCAGGGAGCAGTT
AGGGCCCAACCGACCATTCCTGTGGTGGAGGTCGAAATCGGGAGACCCCGGTCCGTCCCATCGGCCCTTCGTCAACCACGGGGGAGGTCCCTCGTCAAA

1200

GGGCCCCGGCCAGCCCCAGGAGACGGCGAGGGGAGGGAGGAAAGGGAGGAGCGCTCGCCCCCTTCGGCGCTCGCGCGTGCCATTGGC
CCCCGGCGGGCCGGTCGGGTCTCTTCCTCCCGCTCCCCCTCCCCCTCCTCACGGAGCGGGGAAGCGCCGACGGCCGACGGTAACCG

CGAAAGTTCCCGTACGTACGGCGAGGGCAGTTCCTTAAGTCTGTGCACATAACGGGCAGAACGCACTCGGAAGCGGCTTCTTCAGAGCACGGGCTG
GCTTCAAGGGCATGCAGTGCCGCTCCCGTCAAGGGGATTTCAGGACACGTGTATTGCCCGTCTTGGTGACGCTTCGCCGAAGAAGTCTCGTGCCCCGAC

GAAGTGGCAGGCACCGGAGCCCTAGCACCCGACAAGCTGAGTGTGCAGGACGAGTCCCACACACCCACACCGCTGAATGAGGCTTCCAGG
CTTGACCGTCCGTGGCGCTCGGGGATCGTGGGCTGTCGACTCACACGTCCTCAGGGGTGGTGTGGGTGCTCGGCGGACTTACTCCGAAGGTCC

1541 J (-47)

1568 C (-20)

Leader cistron

Met Arg Leu Pro Gly

CGTCCGCTCGGGCCCGCAGAGCCCCGCCGTGGTCCGCCGCTGAGGGGCCCCAGCCAGTGGCTTACCTGCCAGACTGCGCGCATGGGGCAACCCG
GCAGGCGAGCGCCGGCGTCTCGGGCGGCACCCAGCGGGCGACTCCGCGGGGGTGGTTCACGCGAATGGACGGTCTGACCGCGGTACCCCGTTGGGC

Leader cistron

Val Arg Ser Arg Pro Ala Glu Pro Arg Arg Gly Ser Ala Arg

1633 G (+46)

1666 G (+79)

Met Gly Gln Pro

GGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCTAATGAAGGCCATGGCGCGGACCAACGACGTCACGCACCAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCAT
 CCTTGCCGTCGCGGAAGAACGACCGTGGGTTATCTTCGGTACGGGGCCTGGTGTGCAGTGCCTCGTTCCCTGCTCCACACCCACCCCGTACCCTGTA

adrenerger beta2 Rezeptor

Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg Arg Ser His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp Val Val Gly Met Gly Ile

CGTCATGTCCTCATCGTCCTGGCCATCGTGTTGGCAATGTGCTGGTGCATCACAGCCATTGAAAGTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTC
 GCAGTACAGAGAGTAGCAGGACCGGTAGCACAAACCGTTACACGACCAGTAGTGTGGTAACGGTTCAAGCTCGCAGACGCTCTGCCAGTGGTTGATGAAG

1800

adrenenerger beta2 Rezeptor

Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe

Patentansprüche

1. Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens, dadurch gekennzeichnet, daß die Basen an den Positionen 245, 565, 934, 1541, 1568, 1633 und 1666 ganz oder teilweise ausgetauscht sind.

2. Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ganz oder teilweise die Basenaustausche A→G (Position 245), G→A (Position 565), G→A (Position 934), C→T (Position 1541), T→C (Position 1568), A→G (Position 1633) und Gln→Glu (Position 1666) enthält.

3. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1633 A und 1666 C.

4. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 C, 1633 G und 1666 G.

5. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1633 G und 1666 C.

6. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 A und 1666 C.

7. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 C, 1568 C, 1633 G und 1666 G.

8. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 G und 1666 C.

9. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an 4 der 7 Positionen 245, 565, 934,

1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird.

10. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß alle 7 Positionen genotypisiert werden.

11. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.

12. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen 9 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 3 der 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.

13. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen 9, 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen 1541, 1633 und 1666 genotypisiert werden.

14. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Genotypisierung durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind, erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 9 zur Bestimmung einer Disposition für Bluthochdruck und andere cardiovaskuläre Erkrankungen.

16. Verfahren nach Anspruch 9 zur Bestimmung einer individuell unterschiedlichen Reaktivität des autonomen Nervensystems, z. B. auf endogenen und exogenen Streß

17. Verfahren nach Anspruch 9 zur Bestimmung des Verlaufs und des Schweregrads von Erkrankungen, z. B. von neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Angstsyndromen.

18. Verfahren nach Anspruch 9 zur Bestimmung einer Disposition für metabolische Erkrankungen wie Fettsucht.

19. Verwendung der Sequenzvarianten nach Anspruch 1 bis 8 zur Entwicklung von Therapeutika

20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Entwicklung von beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten.

21. Verwendung nach Anspruch 19 zum Aufbau von Genen bzw. Vektoren, insbesondere zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen.

22. Verwendung nach Anspruch 19 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits.

23. Verwendung nach Anspruch 19 und 22 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits zur Vorhersage der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene beta2-Rezeptor-antagonisten sowie -agonisten.

24. Verwendung nach Anspruch 19 und 22 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits zur Vorhersage der unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen.